

발암성 분자와 식품보존제의 광화학 및 열적 반응메카니즘

김민식 · 채기수 · 김갑순 · 성대동*

경남정보대학 식품화학부, *동아대학교 화학과

Photochemical and Thermal Reaction Mechanism for the Reaction of Carcinogenic Molecules and Food Reservatives

Min-Sik Kim, Ki-Su Chae, Kap-Soon Kim and Dae-Dong Sung

Div. of Food & Chemical Engineering, Kyungnam College of Information & Technology,

Pusan 617-701, Korea

*Dept. of Chemistry, Dong-A University, Pusan 604-714, Korea

Abstract

The photochemical carcinogenic reaction mechanism and molecular carcinogenic intensity through the reaction of dibromo carbene and diazomethane with dehydroacetic acid and coumarin have been studied under the two kinds of photolysis. The reaction intensities show the degree of carcinogenic activity. Under the condition of UV/vis light source, the yield of a high toxic carcinogenetic carbene intermediate is produced less than those of the laser flash photolysis.

Key words : carcinogenic molecular, photochemical and thermal reaction mechanism.

서 론

식품보존제는 식품은 물론 의약품에도 널리 쓰이고 있으나 식품보존제가 빛에 의하여 광화학 반응을 일으키거나 혹은 상온 이상의 고온에서 열적 반응을 일으켜서 생성된 2차 화합물이 인체에 어떤 영향을 미칠 것인가에 대한 연구는 적은 편이다. 식품보존제 중 dehydroacetic acid¹⁾는 버터, 마가린, 치즈에 기생하는 곰팡이, 효모 그리고 그람양성균으로부터 이들 식품을 보존하기 위하여 사용하거나 혹은 습진, 피부병 및 충치예방제와 같은 의약품의 보존제로 사용된다²⁾. Coumarin³⁾은 바닐라, 헬리오트로핀(heliotropine, piperonale)등과 같은 식품첨가제와도 잘 혼합되기 때문에 식품은 물론 각종 화장품과 의약품의 보존 첨가제로 쓰인다⁴⁾. 일반적으로 극성이 큰 케톤기를 갖는 유기화합물들은 쌍극자 모멘트에 의한 다른 유기분자들과 공유결합을 잘 형성한다. Dehydroacetic acid와 coumarin은 둘다 분자내 케톤기를 갖고 있어 다른 인접한 분자들과 수소결합을 형성

하거나 쌍극자-쌍극자간 인력에 의한 공유결합을 형성한다⁵⁾.

Diazomethane의 전구물질인 1-methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine(MNNG)와 diazoethane의 전구물질인 1-ethyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine(ENNG)등은 발암물질로 알려져 있다.

MNNG 혹은 diazomethane등과 같은 발암성 물질이 빛에 노출되면 반응성이 큰 카르벤(carbene) 중간체가 생성된다. 이들 카르벤은 화학적으로 불안정하고 높은 에너지를 갖기 때문에 식품에 존재하는 보존제들과 반응하여 유독성 oxonium ylid가 생성될 것이 예상된다. 분자내 케톤기를 갖는 dehydroacetic acid와 coumarin은 카르벤 중간체와 반응하여 상대적으로 화학적 에너지가 낮은 oxonium ylid를 생성할 것이다. 일반적으로 oxonium ylid는 분자내에 있는 $p\pi-d\pi$ 궤도함수 상호간에 강한 작용이 있음이 알려져 있다⁷⁾. Oxonium ylid는 그 자체가 반응성이 크기 때문에 Stevens rearrangement, β -hydride elimination 혹은 [2,3]-sigmatropic shift

반응이 잘 일어난다⁸⁾. Oxonium ylid는 copper acetylacetonate($\text{Cu}(\text{acac})_2$) 등과 촉매 존재하에서 다른 케톤기와 반응하여 고리화-부가 반응을 촉진시킨다⁹⁾.

2-Phenyloxirane을 carboethoxycarbene과 반응시키면 탈산소화 반응과 동시에 고리 확장반응이 일어나면서 삽입반응이 진행된다¹⁰⁾. 이때 단일항 상태의 카르벤 중간체는 2-phenyloxirane의 산소 원자를 공격한 후 oxonium ylid를 만들고 곧이어 styrene과 ethyl glyoxylate로 분해되거나 cis/trans oxetane 혼합물이 생성되는 이성질화 반응을 일으킨다.

본 연구에서는 분자내에 케톤기를 갖는 식품보존제가 발암성 물질의 일종인 카르벤 중간체와 반응하여 oxonium ylid가 생성되는 반응과정을 알아보고 생리활성을 갖는 이들 화합물 상호간의 반응성을 알아보고자 하였다.

실험재료 및 방법

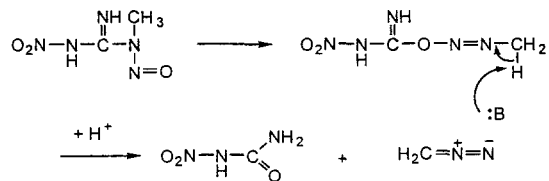
1. 실험재료

식품보존제로 쓰이는 dehydroacetic acid 및 coumarin과 그 유도체의 합성은 다음과 같이 구입하여 정제한 후 사용하였다. Dehydroacetic acid(1) 및 coumarin(2)은 미국 Aldrich제 시약을 구입하여 각각 acetone과 THF로 정제하였고 이들의 물리화학적 상수가 문헌치⁸⁾와 일치하는가를 확인한 후 사용하였다.

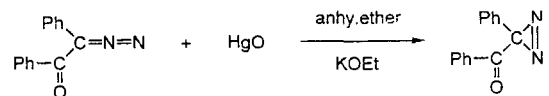
Methylene chloride는 Aldrich제 99+%, A. C. S급 시약을 구입하여 정제한 후 사용하였다. Diethyl ether는 Na 금속을 넣은 후 benzophenone을 absolute indicator를 이용하여 장시간 환류시켜 무수상태로 만들어 사용하였다. Lewis 촉매로 사용한 AlBr_3 는 Aldrich제 98+%무수물을 사용하였다. 그리고 TLC plate는 Merck제 Kieselgel 60 PF₂₅₄ Gipsaltig를 사용하였다. 본 실험에서 사용된 카르벤은 methylene, dibromocarbene, 그리고 phenylbenzildiazomethane(azibenzil)이다. N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(MNNG)을 사용하여 Aldrich Diazald Kit에서 methylene($:\text{CH}_2$)을 발생시켰다.

그리고 dibromocarbene($:\text{CBr}_2$)은 phenyl(tribromomethyl)mercury, $\text{C}_6\text{H}_5\text{HgCBr}_3$ 를 Seyferth 방법¹¹⁾으로 만들어 발생시켰다.

Azibenzil은 Aldrich제 benzilmonohydrazone



을 무수에테르 중에서 산화수은(HgO , yellow)으로 산화시켜 만든 후 methylene chloride/pet. ether를 사용하여 재결정시켰다(m.p. 78~79°C).



2. 실험방법

발암성기작 반응 메커니즘을 알아보기 위하여 사용한 UV/vis spectrophotometer는 Shimadzu UV/vis-240 spectrophotometer와 Kontron Uvikon 860 Spectrophotometer를 사용하였다.

그리고 화합물의 확인에 사용한 기기는 Perkin-Elmer 683 Infrared spectrophotometer, Hitachi 270-30 IR spectrophotometer, Varian XL-200MHz ¹H-NMR spectrophotometer, 그리고 SP-2250과 OV-101 칼럼이 장착된 Hewlett-Packard 5990A GC/MS를 사용하였다. 발암성 작용기작을 알아보기 위해 측정된 반감기는 UV/vis spectrophotometer와 laser system을 사용하였다. 먼저 반감기의 시간단위가 초(sec.), 혹은 분(min.) 단위의 느린 반응은 UV/vis spectrophotometer를 이용하였고, 반감기가 마이크로초(μs) 혹은 나노초(ns) 영역은 Laser Photonics사의 LN1000 nitrogen laser system과 Spectron사의 SL 803-G Nd:YAG pulsed laser system을 사용하였다. 질소 laser는 pulse width가 60 pico 초이고 Nd:YAG laser는 pulse duration이 6~8ns이었다. 반응후 중간체의 방출 스펙트럼은 형광소멸속도로 측정하였다. 형광소멸속도 측정은 Instapec사의 TM-XT detector Model 7716과 Stanford Research사의 Model SR 400 Gated Photon Counting을 사용하였다. 식품보존제와 카르벤 중간체의 반응시 발암성 기작을 알아보기 위하여 반응속도를 측정하였다. 반응속도의 측정은 다음과 같이 시행하였다. 테프론 마개가 있는 UV Cell에 용매 3mL를 넣은 다음 질소기체를 불어

넣어 용매 중에 녹아 있는 용존 산소와 이산화탄소 기체를 날려 보내고 일정온도로 유지하였다. Seyferth 시약과 메틸렌 중간체인 diazomethane의 ether용액을 식품보존제인 dehydroacetic acid와 coumarin과 각각 반응시켰다. 발생하는 발암성 중간체의 농도는 기질에 비하여 100배 이상 되게 하여 반응이 유사 일차반응으로 진행시켰다. 발암성 중간체의 농도는 기질에 비하여 100배 이상 크게 하여 유사 일차반응으로 진행시켜 시간에 따른 변화를 흡광도로 나타낸 후 다음의 Guggenheim식¹²⁾으로부터 유사 일차 반응속도상수를 계산하였다.

$$\ln \frac{A_{\infty} - A_0}{A_0 - A_t} = k_1 t \quad (1)$$

여기서 t_0 는 반응초기의 시간이고, t 는 반응이 진행되었을 때의 측정순간의 시간이며 t_{∞} 는 반응이 완전히 끝난 후의 시간이다. A_0, A_t, A_{∞} 는 각각 t_0, t 및 t_{∞} 에서의 반응물의 최대 흡광도이다. 시간변화에 따른 $\ln(A_{\infty} - A_0) / (A_0 - A_t)$ 의 값을 도시한 직선의 기울기로부터 최소자승법을 이용하여 유사 일차 반응속도상수를 계산하였다. 빠른 반응인 나노초(ns) 혹은 마이크로초(μ s) 영역에서는 laser flash photolysis에서 얻은 방출스펙트럼의 형광소멸시간의 역수로부터 1차 속도상수를 구하였다.

결과 및 고찰

Seyferth시약 및 카르벤 중간체의 전구물질인 diazomethane을 식품보존제인 dehydroacetic acid와 coumarin과 반응시켰을 때의 속도상수를 구하여 Table 1에 각각 나타내었고 Fig. 1에는 laser flash photolysis에서의 형광소멸곡선을 나타내었다. Table 1에서 보면 반응계에 가해준 빛의 세기와

Table 1. Reaction rate constants(sec⁻¹) for the reactions of Seyferth's reagents and diazomethane with dehydroacetic acid and coumarin under the conditions of UV/vis luminescence and laser flash luminescence at room temperature

Food additive reagents	Seyferth reagent		Diazomethane	
	UV/vis	Laser flash	UV/vis	Laser flash
Dehydroacetic acid	9.43×10^{-3}	3.23×10^7	5.72×10^{-2}	3.99×10^7
Coumarin	4.72×10^{-4}	2.27×10^7	4.21×10^{-3}	2.85×10^7

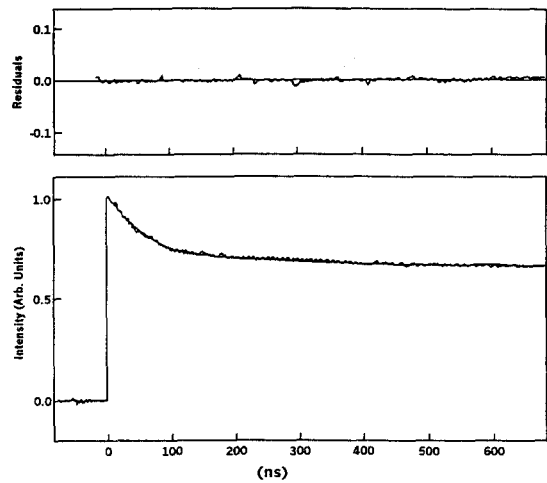
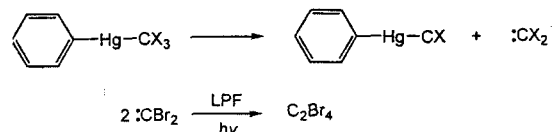


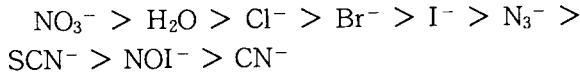
Fig. 1. Transient decay curves of Seyferth's reagent (dibromo carbene precursor) at 437nm.

속도상수는 동일한 반응계에서 크게 차이가 났다. 이것은 조사된 빛의 세기와 밀접한 관계가 있는데 UV/vis 일 때와 laser flash 일 때 생성되는 반응중간체가 각각 다르기 때문일 것이다.

Table 1에서 laser flash photolysis상에서 구한 시간함수로 세기와 상관 관계로부터 구한 속도상수는 Fig. 1에서 보는 바와 같이 레이저 상에서 transient decay곡선의 소멸시간의 역수로부터 계산하였다. 일반적으로 Seyferth 시약은 독성이 큰 발암성 물질로 최근 보고되어 있다¹³⁾. Seyferth 시약은 Scheme I에서 보는 바와 같이 광화학적 분해 반응에 의하여 생성되는 중간체인 dihalo carbene 때문에 생체 특히 이웃해 있는 금속수는 원자에서 떨어져 나갈 때 전하분포가 carbene쪽으로 크게 이동하여 아틸기의 수는 원자에서 상대적으로 (+)하전이 크게 증가될 것이다. 금속원자에 붙어있는 음 이온기에 따라 발암성과 항암성이 크게 달라지는데 Speziale¹⁴⁾에 의하면 cis-dichloro diamine platinum {cis-[Pt(NH₃)₂Cl₂]}는 오히려 항암성이 증가된다고 하였고 Rainen¹⁵⁾ 등 trans-dichlorodiamine platinum의 발암성이 증가한다고 하였다.



이들의 연구 결과에 의하면 동일한 백금원자에 결합되어 있는 치환기의 이탈능력에 따라 발암성 및 항암성이 다음과 같은 순서로 달라진다고 하였다.

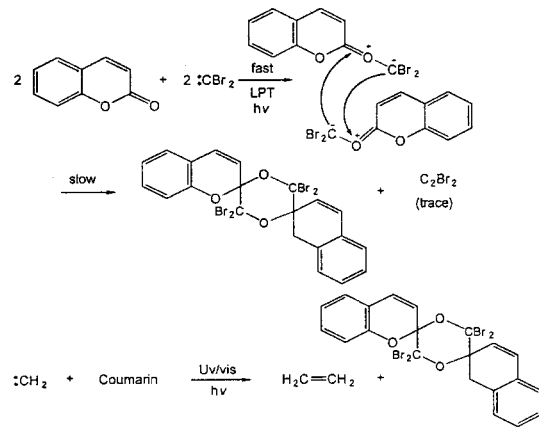


여기서 NO_3^- 이온으로 갈수록 발암성이 크고 CN^- 쪽으로 갈수록 독성이 작다고 하였다. 즉 치환활성이 큰 이탈기를 가진 금속 착물은 독성이 크다고 하였다. 그리고 치환 불활성인 운반기로서 N원자를 가진 금속착물의 항암성의 크기는 아민의 유도체에 따라서 $\text{NH}_3 < \text{R-NH}_2 > \text{R}_3\text{-N}$ 순으로 나타난다고 하였다. Seyferth 시약이 광화학적 분해반응시 생성되는 dibromo carbene 중간체와 diazomethane이 분해할 때 생성되는 메틸렌 중간체는 이탈능력과 치환 삽입활성이 아주 크기 때문에 식품보존제와 반응하여 발암성이 크게 나타날 것이 예상된다. Boudreaux¹⁶⁾는 guanine과 *cis*-dichlorodiamine platinum이 반응할 때의 여러 가지 기하학적 전자밀도분포를 구하였다. 이들은 각 원자들이 갖는 하전량의 변화, orbital overlap population density를 계산하여 guanine의 질소원자와 산소원자에 *cis*-dichlorodiamine이 강하게 결합하는 것을 설명하였다.

본 연구에서 사용한 dibromo carbene과 methylene은 광원이 UV/vis에서 보다는 LFP에서 발암성이 큰 dibromo carbene과 methylene의 활성이 크게 나타남을 알 수 있다. Table 1에서 보는 바와 같이 속도상수의 크기에 비례하여 발암활성이 커지는 것을 예상할 수 있는데 식품보존제인 dihydroacetic acid와 coumarin이 Seyferth 시약과 diazomethane과 반응했을 때 생성되는 반응중간체는 예상대로 Nd:YAG laser flash photolysis에서 크게 나타

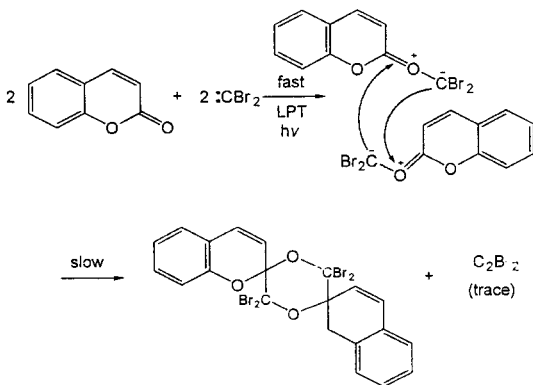
났다. 두 반응에서 생성된 생성물을 기체 크로마토그래프상에서 분리한 후 $^1\text{H-NMR}$ 과 IR 및 GC/MS로 확인한 결과 laser flash 상에서 얻은 생성물은 dehydroacetic acid와 coumarin에 직접 dibromo carbene과 methylene이 삽입된 반응생성물이었다. 그러나 UV/vis 상에서 얻은 생성물은 1,1,2,2-tetrabromo ethene과 동시에 소량의 dibromo carbene 삽입 반응 생성물이 생성되었다. 속도자료와 반응생성물로부터 이들 반응은 Scheme II에서 보는 바와 같은 반응 경로로 진행할 것이 예상된다.

그리고 diazomethane과 반응시의 예상 반응경로는 Scheme III에 나타내었다.



Scheme III

Dehydroacetic acid도 coumarin과 같은 반응 메커니즘으로 진행하여 얻어진 광화학 반응생성물을 GC/MS와 $^1\text{H-NMR}$ 로 확인하였다. 이들의 결과로 조사해 준 빛의 세기에 따라 크게 다르게 나타났다. Seyferth시약과 dehydroacetic acid와 coumarin의 반응에서 생성된 반응 중간체인 dibromo carbene은 LFP 조건에서 많이 생성되는데 이것은 Hg-CBr₂의 결합에너지와 MO 에너지의 값이 음(-)으로 크게 나타나기 때문일 것이다. 따라서 LFP조건에서 dehydroacetic acid와 coumarin에 반응하는 Seyferth 시약의 발암성은 크게 된다. 그리고 Table 1에서 보는 바와 같이 dehydroacetic acid가 coumarin 보다 속도 상수가 어느 경우에서나 크게 나타나는데 이것은 UV/vis 조건에서나 LFP 조건에 관계없이 dehydroacetic acid의 분자구조가 coumarin 보다 dibromo carbene과 반응하여 제2의 ylid 중간체를 형성하는 확률이 크기 때문일 것이다. Carbonyl ylid나 oxonium ylid 중간체가 coumarin에서는 단지 2 위치의 ketone기에서만 생성되는 반



Scheme II

면에 dehydroacetic acid의 경우 carbonyl ylid 중간체 혹은 oxonium ylid의 중간체가 생성될 확률은 2 위치와 4 위치 및 3 위치에 치환된 acetate의 3군데의 ketone기에서 carbonyl ylid 중간체 및 oxonium ylid 중간체가 생성되기 때문일 것이다. 따라서 dibromo carbene과 반응할 때 발암성의 크기는 coumarin보다 dehydroacetic acid의 경우 더욱 크게 나타날 것이다.

요 약

Seyferth 시약인 phenyl(tribromomethyl)mercury 및 diazomethane의 식품보존제인 dehydroacetic acid 및 coumarin과의 발암성과 그 반응기작을 분자 구조적 관점에서 알아보기 위하여 UV/vis 조건과 laser flash photolysis 시켰을 때의 결과는 다음과 같다.

1. Diazomethane과 phenyl(tribromomethyl)mercury와 dehydroacetic acid와 diazomethane과의 반응은 광화학적 분해 반응에서 생성된 $:CBr_2$ 와 $:CH_2$ 카르벤 중간체의 이탈기 효과에 따라 발암성이 크게 나타났다.
2. Laser flash photolysis 상에서 반응시켰을 때 식품보존제의 발암성이 UV/vis 상에서의 photolysis 때보다 크게 나타났다.

감사의 말

본 연구는 1997학년도 경남전문대학의 학술연구비 지원으로 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Puyvelde, L. V., Kimpe, N. D., Mudaheeranwa, J. P. and Schamp, N. : Bio-Organic Heterocycles

- 1986-Synthesis, Mechanisms and Bioactivity. Proceedings of the 4th FECEM Conference on Heterocycles in Bio-Organic Chemistry, Houthalen, Belgium, p. 265(1986).
2. Windholz, M., Budavari, S., Blumetti, R. F. and Otterbein, E. S. : *The Merck Index*, 10th ed., p. 463(1983).
3. Meuly, W. C. : *Encyclopedia of Chemical Technology*, Kirk-Othmer, Wiley-Interscience, New York, 3rd ed., p. 196~206(1979).
4. Krishnamurti, M., Sambhy, Y. R., and Seshadri T. R. : *Tetrahedron*, p. 3023(1970).
5. Crombie, L. and Whiting, D. A. : *J. Chem. Soc.*, p. 1569(1963).
6. Hudlicky, M. : *J. Org. Chem.*, 45, p. 5377(1980).
7. Olah, G. A., Doggweiler, H. and Feldferg, J. D. : *J. Org. Chem.*, 49, p. 2112(1984).
8. Trost, B. M., King, S. A. and Schmidt, T. : *J. Am. Chem. Soc.*, 111, p. 5902(1989).
9. Ibata, T., Toyoda, J., Sawada, M. and Tanaka, T. : *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, p. 1266(1986).
10. Nogaki, H., Takaya, H. and Noyori, R. : *Tetrahedron*, 22, p. 3393(1966).
11. Seyferth, D. and Lamber, R. L. : *J. Organomet. Chem.*, 16, p. 21(1969).
12. Guggenheim, E. A. : *Philos. Mag.*, 2, p. 538(1926).
13. Speziale, A. and Ratts, K. W. : *J. Am. Chem. Soc.*, p. 854(1962).
14. Seyferth, D. and Burlitch, J. M. : *J. Organomet. Chem.*, 4, p. 127(1965).
15. Rainen, L. et. al. : *Inorg. Chem.*, 14, p. 2752(1975).
16. Boudreaux, E. A. : *Chem. Biol. Interactions.*, 30, p. 189(1980).

(1998년 3월 23일 접수)